

研 究 報 告 書

「細胞の極性形成に関わる膜ドメインの形成・維持機構の解明」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：池ノ内 順一

1. 研究のねらい

上皮細胞の細胞膜は、消化管や腎尿細管などの管腔に面するアピカル膜と、基底膜と接するバソラテラル膜に分けられる。アピカル膜とバソラテラル膜の境界に、タイトジャンクションと呼ばれる細胞接着構造が認められる。このように上皮細胞には様々な膜ドメイン(細胞膜区画、細胞膜領域)が存在することが知られている。

細胞膜の主たる構成成分は、膜タンパク質と脂質分子である。近年の研究により、膜ドメインにそれぞれ特異的な膜タンパク質が存在することが明らかになった。一方、脂質分子については、それぞれの細胞膜領域に異なる種類の脂質分子が存在するか否か、については、ほとんど明らかになっていない。本研究提案の1つ目の狙いは、上皮細胞の様々な細胞膜ドメインは、それぞれ特徴的な脂質組成になっているか、を明らかにすることである。特にタイトジャンクションの細胞膜領域の脂質分子組成について詳細に解析し、細胞膜構造の形成における脂質代謝の重要性や膜タンパク質と脂質分子の自己組織化過程について考察した。

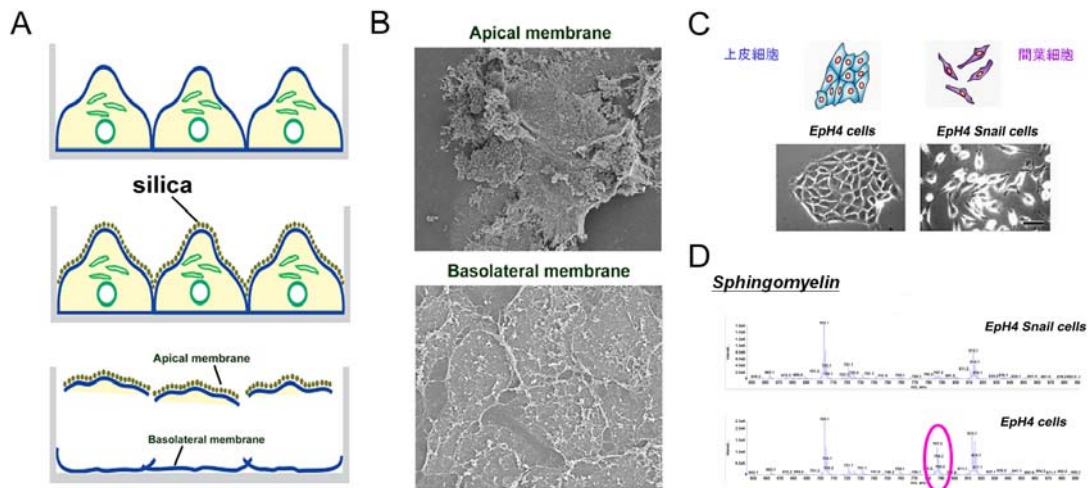
2つ目の狙いは、細胞膜ドメインを形成する上で、膜タンパク質や脂質分子の自由拡散を防いでいる分子機構の解明である。これまで長らく上皮細胞のアピカル膜とバソラテラル膜の分離にはタイトジャンクションが不可欠であるとされてきた。しかしながら、研究代表者らは、遺伝子操作によりタイトジャンクションを消失した細胞を樹立し、タイトジャンクションが無くてもアピカル膜とバソラテラル膜の分離が正常に起こることを報告した(*Cell* 2006; *JCB* 2007)。そこでアピカル膜とバソラテラル膜の分離に関する新たな分子機構を提唱すべく、アピカル膜及びバソラテラル膜の分離に関わる新規遺伝子群の探索を行った。

2. 研究成果

(1) 細胞膜を構成する脂質分子組成の解析法の確立

細胞を構成する脂質は数千種類あることが知られているが、どのような脂質が細胞膜(形質膜)上に存在しているか、に関する情報は極めて断片的である。細胞膜を構成する脂質は、細胞全体の脂質のわずか1%であり、細胞膜の脂質組成を知ろうとすると、細胞膜のみを単離する必要がある。これまでの細胞膜の単離手法には、界面活性剤が必要不可欠であった。界面活性剤の利用は、膜タンパク質の解析には大きな影響を及ぼさないが、脂質の解析を行う上では大きな障害となる。なぜならば、界面活性剤と脂質は容易にミセルを形成し、異なる膜分画同士を自由に行き来してしまい、正確な脂質組成を求めることを困難にしてしまうからである。そこで私は、界面活性剤の代わりに、コロイド状シリカ粒子を用いて、細胞膜のみを単離する技術を確立した。図 A に示すように、細胞に対して、陽電荷を付与した直径 80nm のシリカ粒子を付着させる。細胞膜は、負電荷を帯びているため、シリカ粒子は細胞膜に強く結合する。シリカ粒子を細胞膜に付着させた後、細胞を破碎する。細胞破碎液を密度勾配遠心にかけることにより、シリカ粒子のついた細胞膜(アピカル膜画分)はペレットとして沈殿する。そのほかの膜成分(細胞内小器官や核膜など)は、シリカ粒子がついていないため、沈殿しない。またバソラテラル膜は、破碎時に培養皿に残る膜画分として回収される(図 B)。このようにして、細胞膜を単離し、単離細胞膜から従来の Bligh & Dyer 法により脂質を抽出した後、液体クロマトグラフィで分離し、質量分析計で解析することにより、個々の脂質分子種の解像度で、細胞膜を構成する脂質分子の組成を決めることが出来るようになった。

この手法を用いて、マウス由来の培養上皮細胞(EpH4 細胞)および EpH4 細胞を遺伝子操作により間葉細胞に転換した細胞(図 C)から、それぞれ単離した細胞膜を構成する脂質分子の解析結果の一部を図 D に示す。



(2) タイトジャンクションを構成する脂質の同定と機能解析

タイトジャンクション(以下 TJ)は、上皮細胞に認められる細胞接着構造であり、この領域において隣あった細胞同士の2枚の細胞膜はゼロの距離に近づく(図 A)。TJ は、上皮細胞の間隙を通るイオンや小分子の透過性を制御し、生体内の恒常性を維持する上で必須の構造である。TJ は図 A に示すように電子顕微鏡観察により、形態学的に極めて特徴的な細胞膜ドメインであることが知られている。このため、TJ 領域の細胞膜構造のモデルとして、1)他の細胞接着装置と同様に膜タンパク質同士が接着するとする「タンパク質モデル」と、2)コーン型脂質分子によって形成される逆ミセル構造を主体とする「脂質モデル」の二つの対立する説が提唱されてきた(図 B、C)。1998 年に TJ を構成する膜タンパク質クローディンが同定され、間葉細胞にクローディンを発現させるだけで TJ が再構成されるという観察事実(図 D)に基づいて、現在では「タンパク質モデル」が広く受け入れられている(図 C)。しかしながら、TJ は、水やイオンの透過性をも制御する細胞膜接着構造である点を考慮すると、クローディンの細胞外領域が細胞膜から突き出した構造で果たしてイオンや水の透過性を制御できるか、疑問が残る。私は、クローディンと特定のコーン型脂質分子種が協調して逆ミセル構造を主体とする膜構造とっているのではないかと考えた(図 E)。

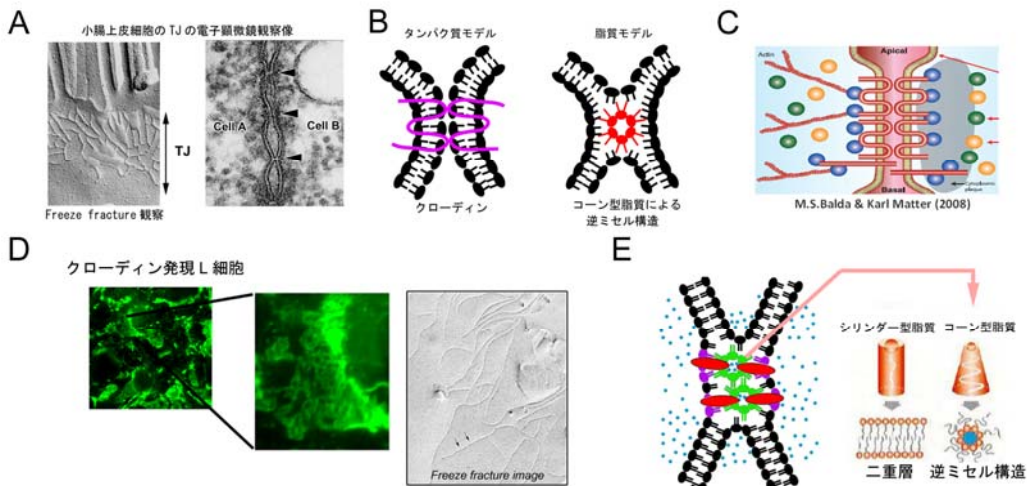
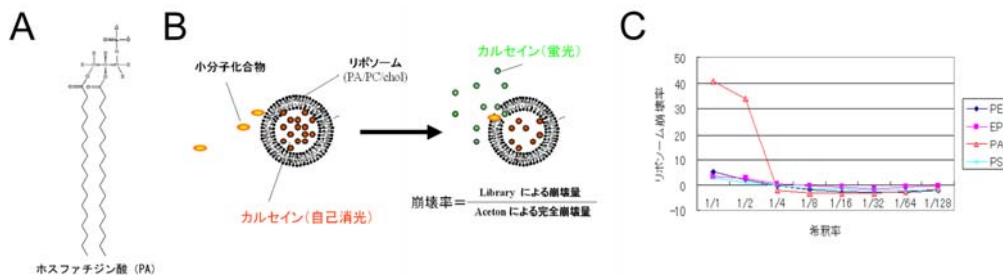


図 D で示したクローディン発現 L 細胞と、TJ を持たない元来の L 細胞から細胞膜のみを単離して質量分析による脂質分子組成の解析を行ったところ、興味深いことに、特定の脂質分子種がクローディン発現 L 細胞の細胞膜に多く含まれていた。更に図 E のモデルを詳細に

検証する目的で、TJ 細胞膜領域の脂質組成を反映させたリポソームと精製したクローディングタンパク質を用いて TJ の試験管内再構成に取り組んでいる。

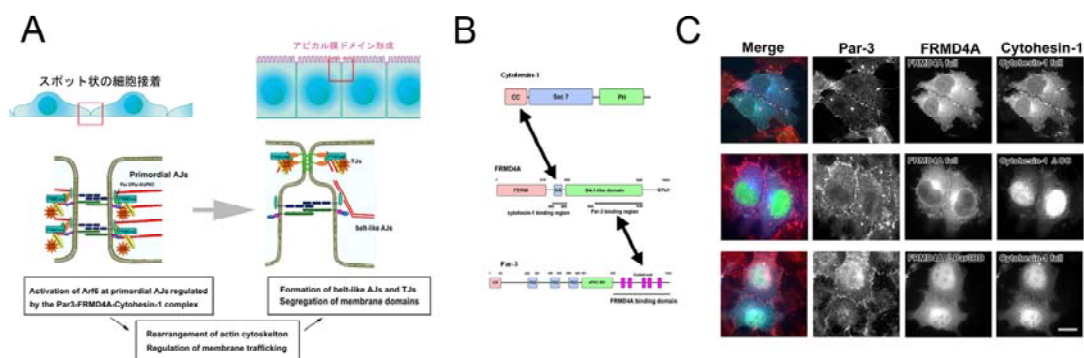
(3) 脂質分子を可視化する為の小分子プローブの探索

生体膜を構成する脂質分子の機能を解析する上で、細胞における局在を知ることは重要な手がかりになる。ライセニン(スフィンゴミエリン)や、PHドメイン(PIP2)などの特定の脂質分子に特異的に結合するプローブがこれまでに報告されている。しかし現在、多くの脂質分子については、特異的なプローブが存在せず、細胞内局在が不明である。リン脂質の一つ、ホスファチジン酸(PA: 図 A)は、小胞輸送やシグナル伝達などの生命現象において重要なリン脂質であるという報告がなされているが、有効なプローブが存在しないため、細胞内局在について不明である。そこで、PA のプローブの候補となる化合物を見つけ出す目的で、約 2000 種類の真菌の培養上清ライブラリーをスクリーニングした。まず、蛍光色素カルセインを内包させた様々な脂質組成のリポソームを作製し、培養上清を添加した際にPAを含むリポソームのみを選択的に崩壊させるか否か、について調べた(図 B)。結果、目的の真菌培養上清を 1 株同定した(図 C)。現在、この上清中に含まれるPAに結合する化合物について、液体クロマトグラフィとNMRを用いて、分離・精製と物質の同定を進めている。



(4) 上皮細胞の細胞膜ドメインの分離に関わる分子機構の解明

上皮細胞のアピカル膜およびバソラテラル膜という非対称な細胞膜ドメインの形成に関わる新規遺伝子の探索を行った。上皮細胞は細胞接着を失うと、アピカル膜・バソラテラル膜の非対称性(細胞極性)を維持できなくなる。この点に着目して、細胞の接着を一度壊し、再度細胞接着を誘導する過程で、細胞接着部位に濃縮するタンパク質は、細胞膜ドメインの形成に重要ではないかと考えた。上皮細胞は、間葉細胞と同様に、細胞接着の初期には、スポット状の細胞接着を形成する(図 A)。スポット状細胞接着同士が融合して、細胞の全周を取り囲むようなベルト状の細胞接着装置が形成されると、細胞膜のアピカル膜とバソラテラル膜が分離される。上皮細胞の極性形成に重要とされる遺伝子群として、ZO-1,ZO-2,Par-3,Par-6,aPKC などが知られているが、いずれも上皮細胞の細胞接着初期過程においてはスポット状の接着部位に局在し、後期過程においては、タイトジャンクションに局在する。細胞接着過程で、同様の局在の変化を示すタンパク質をスクリーニングした結果、新規遺伝子である FRMD4A(FERM domain containing 4A)を同定した(図 B)。FRMD4A 遺伝子および FRMD4A と高い相同性を示す遺伝子である GRSP-1 を同時にノックダウンすると極性形成過程が顕著に遅延した。Yeast two hybrid 法により FRMD4A の結合相手を探した結果、FRMD4A は、前述の Par-3 と Arf6 の活性化因子 Cytohesin の双方に結合する Scaffolding タンパク質であることがわかった(図 C)。



3. 今後の展開

細胞膜単離手法と質量分析を用いた脂質分子種の同定を組み合わせることにより、細胞の種類や細胞膜の領域によって、細胞膜を構成する脂質分子種に違いがあることが明らかになった。今後は、脂質代謝酵素や脂質輸送タンパク質の発現や局在に着目して脂質分子種の違いを生み出す分子群の同定を試みると共に、このような脂質分子種の違いが、細胞膜の構造や細胞固有の機能の違いにどのように寄与しているかについて詳細に解析したい。

また、上皮細胞に於いて細胞膜を分離して細胞の極性の形成に関わる分子メカニズムについては、今回のさきがけ研究で同定した新規タンパク質複合体 FRMD4A-Cytohesin-1 の下流で機能する分子群の同定を行い、Lateral diffusion barrier の実体を明らかにしたい。

4. 自己評価

本研究で提案した細胞膜脂質の解析法の確立については、当初の目的どおり、細胞膜ドメインにおける構成脂質分子種の違いを明らかにできるようになった。特にタイトジャンクションに着目して、タイトジャンクションの脂質分子種組成と細胞膜構造の関連について、独自性の高い結果を得ることが出来たと考えている。今後は、試験管内再構成系を用いて、タンパク質と今回同定した脂質分子の相互作用の様式を物理化学的手法により解析し、細胞膜の高次構造がどのように組織化されているかについて検討したい。

膜タンパク質や脂質分子の自由拡散を防いでいる分子機構の解明については、上皮細胞において細胞極性形成に関わる新たな遺伝子 FRMD4A を同定した。しかしながら、その下流で働く分子群の同定などの詳細な機能解析には至らなかった。今後の研究で、FRMD4A 遺伝子の機能と細胞骨格や細胞内輸送との関連に着目し、細胞膜ドメイン形成機構の解明を行いたい。

5. 研究総括の見解

界面活性剤を用いずにアピカル膜を単離する方法を確立し、タイトジャンクション(TJ)を形成する膜にコーン型脂質のプラズマローゲン型 PE が多く含まれること、更にこの脂質の生合成を阻害すると TJ の形成が抑制されることを明らかにし、TJ が蛋白質と脂質から形成されるとする池ノ内モデルを支持する結果を得た。更に、上皮細胞の極性形成に関与する蛋白質として FRMD4A を見出し、これが Par3 など極性に関わる蛋白質と結合することも明らかにした。これらの成果は極めてオリジナリティーの高い成果であり、今後更に発展するものと期待している。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Ikenouchi J, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S.

	<p>“Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin.” <i>Molecular Biology of the Cell</i> 19:4687–93. 2008</p>
	<p>2. Ikenouchi J, Umeda M. “FRMD4A regulates epithelial polarity by connecting Arf6 activation with the PAR complex.” <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 107:748–53. 2010</p>
	<p>3. Masuda S, Oda Y, Sasaki H, Ikenouchi J, Higashi T, Akashi M, Nishi E, and Furuse M. “LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells.” <i>Journal of Cell Science</i> 124:548–55. 2011</p>
	<p>4. Yoshihara K, Ikenouchi J, Izumi Y, Akashi M, Tsukita S, and Furuse M. “Phosphorylation state regulates the localization of Scribble at adherens junctions and its association with E-cadherin-catenin complexes.” <i>Experimental Cell Research</i> 317:413–22. 2011</p>

(2)特許出願

なし

(3)その他

招待講演

1. 池ノ内順一

Cell Surface Polarity In Epithelial Cells

Cell Cycle and Cell Architecture(名古屋)

2009年2月28日

2. 池ノ内順一

上皮細胞の細胞膜ドメインを規定する脂質の探索

第61回日本細胞生物学会(名古屋)

2009年6月3日

受賞

1. 第61回日本細胞生物学会 優秀若手発表賞 「上皮細胞の細胞膜ドメインを規定する脂質の探索」(2009年6月3日)

著作物

1. 池ノ内 順一

「上皮細胞の極性形成—膜ドメイン形成・維持機構の観点から」

蛋白質 核酸 酵素 Vol. 52, No. 14, 1863–1870 (2007)

2. 池ノ内 順一、梅田真郷

「上皮細胞の細胞膜における膜ドメイン」

実験医学 Vol. 28, No. 8, 1212–1219 (2010)